

## ヘキサナール刺激でドーパミンを放出した PC12 細胞のドーパミンの再蓄積作用

Reaccumulation of dopamine into a rat pheochromocytoma cell line, PC12, after stimulation with *n*-hexanal

小林 葉子

Yoko Kobayashi

## 要約

すべての食品に匂い(香り)がある。食品に含まれる匂い(香り)物質は、食品中の栄養素と同様に体内に取り込まれ、生理作用を示すと考えている。ヘキサナールは炭素数6の直鎖アルデヒドであり、植物特有の新鮮な香りを構成している物質の1つである。これまでに、私たちは、ヘキサナールがラット脳線条体切片及びラット副腎褐色細胞腫(PC12)細胞からのドーパミン放出を促進することを報告している。

ドーパミンを放出した細胞は、次の刺激に応答するために、細胞内にドーパミンを再蓄積する必要がある。本研究では、ヘキサナール刺激によりドーパミンを放出したPC12細胞のドーパミン再蓄積について検討した。ヘキサナール刺激を受けたPC12細胞内のドーパミン量は、1時間で、刺激を受けていない細胞と同程度まで回復した。ドーパミンの再蓄積は、ノルアドレナリン及びセロトニン再取込み阻害薬であるイミプラミンにより阻害された。しかし、ドーパミンの前駆体であるチロシンによる有意な影響は検出されなかった。すなわち、ヘキサナール刺激後のPC12細胞内へのドーパミンの再蓄積には、新たなドーパミン合成よりも、イミプラミンが作用するモノアミン輸送体による再取込みが関与することが示唆された。生体においても、血流中のヘキサナール濃度が減少すれば、ドーパミンを放出した細胞内にドーパミンが再蓄積されると考えられる。

キーワード：ドーパミン, PC12 細胞, ヘキサナール, イミプラミン

## はじめに

ヘキサナール (*n*-Hexanal) は、炭素数6の直鎖アルデヒドであり、植物の新鮮な匂い(香り)を構成する物質の1つである。強い匂い(香り)をもつことから、ヘキサナールは、自然食品に含まれているだけでなく、バターやジャムなどの加工食品の香料としても用いられている。

一般的に、匂いは、匂い物質に対する嗅覚受容体に結合し、その信号が脳に伝達され、匂いを感知するとされている。食品に含まれる匂い(香り)物質も例外ではなく、嗅覚受容体に結合し、匂い(香り)を感知する。しかし、食品中に含まれる匂い(香り)物質の多くは、食品中の栄養素と同じように消化器官を介して体内に移行すると考えられる。それを裏付けるように、匂い(香り)の強い食べ物を食べると体からその匂いが発生する、ということや、ガムに含まれる香料

の匂いが体から発生する、ということや、私達も経験している。私たちは、食品と共に体内に移行した匂い(香り)物質が、生理作用を持つと考え、研究を続けてきた。そして、植物特有の新鮮な匂い(香り)を構成する匂い(香り)物質がラット脳線条体切片や神経細胞のモデル細胞として用いられるラット副腎褐色細胞腫(PC12)細胞からの神経伝達物質の1つであるドーパミンの放出を促進することを報告している<sup>1-3)</sup>。ラット脳線条体切片からのドーパミン放出促進作用は、濃度依存的であり、炭素数6のアルコール及びアルデヒド類の中でもヘキサナールが強い促進作用を示した<sup>1)</sup>。PC12細胞に対しても、ヘキサナールは濃度依存的にドーパミン放出を促進するが、その作用濃度に線条体切片との違いも見られた<sup>1-3)</sup>。小胞モノアミン輸送体の阻害剤であるレセルピンでPC12細胞を処理すると、ヘキサナールによるドーパミン放出量は減少した。すなわち、ヘキサナール刺激による

ドーパミン放出は、小胞に存在するドーパミンに由来することが示唆された<sup>3)</sup>。

血液中の匂い(香り)物質濃度が減少すれば、ドーパミンを放出した細胞は次の刺激に備え、細胞内にドーパミンを再蓄積する必要がある。ドーパミンは、アミノ酸であるチロシンからチロシン水酸化酵素及び芳香族アミノ酸脱炭酸酵素により、L-ドーパ(L-DOPA)を介して合成される。合成されたドーパミンは、ドーパミンβ水酸化酵素によりノルアドレナリンに、細胞外ではモノアミン酸化酵素(Monoamine oxidase, MAO)により3,4-ジドロキシフェニル酢酸(3,4-Dihydroxy-phenylacetic acid, DOPAC)へ、さらには、カテコール-O-メチル基転移酵素(Catechol-O-methyltransferase, COMT)によりホモバニリン酸(Homovanillic acid, HVA)に、細胞内ではCOMTにより3-メトキシチラミン(3-Methoxytyramine, 3-MT)に、そしてMAOによりHVAに代謝される。神経細胞内で合成されたドーパミンは刺激に応じて放出され、神経間隙に放出されたドーパミンは神経前細胞に存在するドーパミン輸送体により再取込みされ、再利用される<sup>4)</sup>。

本研究では、PC12細胞を用いて、ヘキサナール刺激後の細胞内へのドーパミン再蓄積について検討した。

## 方法

### 1. 試薬

L-ドーパ(L-DOPA)はナカライテスク(京都)、ドーパミン塩酸塩(Dopamine hydrochloride)、(±)-エピネフリン塩酸塩((±)-Epinephrine hydrochloride, 別名±アドレナリン)、ジヒドロキシフェニル酢酸(Dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC)、ホモバニリン酸(Homovanillic acid, HVA)、3-メトキシチラミン(3-Methoxytyramine hydrochloride, 3-MT)、DL-ノルエピネフリン塩酸塩(DL-Norepinephrine hydrochloride, 別名DL-ノルアドレナリン塩酸塩)、セロトニン・クレアチニン硫酸塩一水和物(Serotonin creatinine sulfate monohydrate)、5-ヒドロキシインドール-3-酢酸(5-Hydroxyindole-3-acetic acid, 5HIAA)、ノミフェンシンマレイン酸塩(Nomifensine maleate salt)、4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid(HEPES)はシグマアルドリッチジャパン合同会社(東京)、ウマ血清(Horse serum, HS)はEquiteck Bio Inc. (Texas, USA)、ウシ胎児血清(Fetal bovine

serum, FBS)、ペニシリン及びストレプトマイシンはサーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社(神奈川)、ダルベッコ改変イーグル培地液体培地(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)、アミノ酸分析用クエン酸一水和物、HPLC分析用メタノール、イミプラミン塩酸塩(Imipramine hydrochloride)、カルシウム及びマグネシウム不含ダルベッコリン酸緩衝生理食塩液(Dulbecco's phosphate buffered saline (-), PBS)及びその他の試薬は和光純薬工業株式会社(大阪)のものを用いた。

### 2. PC12細胞の培養

PC12細胞は、10% HS及び5% FBSを含むDMEM(DMEM-10% HS-5% FBS)を用いて5% CO<sub>2</sub>、37℃で培養した。PC12細胞を継続的に培養する際には、培養液に100 units/mL ペニシリンG、100 µg/mL ストレプトマイシン硫酸塩を添加した。また、HS及びFBSは、56℃に30分置き、非動化したものを用いた。

### 3. PC12細胞のドーパミン再蓄積の測定

PC12細胞は、ポリエチレンイミンでコーティングをした24穴プレートにDMEM-10% HS-5% FBSを用いて2×10<sup>5</sup>細胞/穴で播種した。1-2日間培養し、セミコンフルエントに達したことを確認後、実験に用いた。

PC12細胞から培養液を除き、PBSで一度洗浄した。その後、PC12細胞にクレブス-リンゲル-HEPES緩衝液(Krebs-Ringer HEPES buffer, KRH)を300 µL/穴で加え、37℃に10分間置いた。各穴の細胞の上清は、刺激前試料(Prestimulation)として回収した。その後、再度、4 mM (0.05%)ヘキサナールを含むKRHを300 µL/穴で細胞に加えて10分間刺激し、細胞外液を刺激後試料(Stimulation)として回収した。ヘキサナールを含むKRHを作成する際には、ヘキサナールを最終濃度の100倍の濃度でエタノールに溶解し1%の割合でKRHに添加した。対照には、溶媒であるエタノールを1%の割合で添加した。KRHで細胞を一度洗浄後、KRHを300 µL/穴でPC12細胞に添加し、37℃で1時間置いた。細胞外液(Interval)を回収後、直ちに細胞は冷生理食塩水で9回洗浄し、1穴当たりの細胞をKRH 300 µLに懸濁し細胞試料(Cells)とした。ドーパミン合成作用を検出する際には、ドーパミンの前駆体である50 µMチロシンを含むKRH(KRH+Tyr)、ドーパミンの再取込み作用を検

出す際には、ドーパミン再取込み阻害薬であるノミフェンシン (Nomifensine), 及び, セロトニンやノルアドレナリン再取込み阻害薬であるイミプラミン (Imipramine) をそれぞれ 10  $\mu$ M, 及び, 50  $\mu$ M で含む KRH (KRH+Nomifensine-Imipramine) を用いた. チロシン, ノミフェンシン, イミプラミンを単独, あるいは, 複数添加する場合にも, それぞれ 50  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M で添加した.

細胞試料は, 氷上で超音波処理後, 4 $^{\circ}$ C, 15,000 rpm, 20 分間遠心し, その上清を回収した. また, 刺激前, 刺激後, 及び, 細胞外液試料は回収後, ただちに氷上に移した. それぞれの試料に内部標準液である Isoproterenol (ISO) を含む冷 2 M 過塩素酸 (Perchloric acid, PCA) 75  $\mu$ L (試料の 4 分の 1 量) を添加した. 10 分後, 1 M 酢酸ナトリウム 150  $\mu$ L (試料の 2 分の 1 量) を中和するために添加し, 4 $^{\circ}$ C で 15,000 rpm, 20 分間の遠心を行った. 遠心により得られた上清をモノアミン量の測定に用いた.

#### 4. 高速液体クロマトグラフィーを用いたドーパミン量の測定

ドーパミン量及びその代謝物量の測定は, 小林<sup>5)</sup>の方法に従い, 蛍光検出器を装備した高速液体クロマトグラフィー装置 (High performance liquid chromatography, HPLC) LaChrom Elite, (株式会社日立ハイテクノロジー, 東京) を用いて行った. HPLC で分析する際, 測定試料及びモノアミン標準液希釈試料は, 10 $^{\circ}$ C に保持した. 分離カラムは逆相カラム SC-50DS ( $\Phi$  2.1 mm  $\times$  150 mm, 株式会社エイコム, 京都) を用い, 16%メタノール及び 190 mg/L オクタスルホン酸ナトリウムを含む 0.1 M クエン酸-酢酸緩衝液を流速 0.2 mL/分 で流し, 分離した. 1 回の測定あたり測定試料 20  $\mu$ L を用いた. 検出するための測定波長には, 励起波長 225 nm-蛍光波長 310 nm を用いた. 得られたクロマトグラフから Agilent OpenLAB (EzChrom edition) Ver. A.04.06 (アジレント・テクノロジー株式会社, 東京) を用いて, それぞれのピーク面積を求めた.

モノアミン標準液として, L-DOPA, ノルアドレナリン, アドレナリン, DOPAC, ドーパミン, 5HIAA, HVA, 3-MT, セロトニンをそれぞれ 1 mM に 1 M PCA で溶解し, 段階的に希釈して用いた. 試料と同様に, 内部標準である ISO を含む PCA 及び酢酸ナトリウムを添加後, HPLC で分離, ピーク面積を求めた. ドーパミン及びその代謝物の濃度の算出の際には, 標準液の濃度と ISO のピーク面積に対する

ドーパミンあるいはその代謝物のピーク面積の比の相関を求め, その相関から試料中の濃度を求めた.

#### 5. 有意差検定

有意差検定は, 統計解析ソフト IBM SPSS ver.22 (日本アイ・ビー・エム株式会社, 東京) を用いて行った. 一元配置分析後, Turkeys の検定法により解析し,  $P < 0.05$  のものを有意差有とした.

## 結果

### 1. ヘキサナール刺激後の細胞内ドーパミン量の時間的变化

4 mM ヘキサナールあるいは, その溶媒であるエタノールを含む KRH 中で 10 分間で刺激をした PC12 細胞を 50  $\mu$ M チロシン存在下で 10, 30, 60 分置き, 細胞内ドーパミン量を測定した (図 1). ドーパミン放出促進作用のないエタノールで刺激した PC12 細胞内のドーパミン量は, 刺激直後から細胞内には刺激前試料中の 17 倍のドーパミン量を含み, 1 時間置いてもほとんど変化はなかった. 一方, 4 mM ヘキサナールで刺激をした PC12 細胞内のドーパミン量は, ヘキサナール刺激前試料中に含まれるドーパミン量に対して, ヘキサナール刺激直後では約 5 倍のドーパミン量であったが, チロシン存在下に 1 時間置くことにより 14 倍にも増加した. ヘキサナールで刺激をした PC12 細胞内のドーパミン量は, チロシンを含む KRH 中に 1 時間置くことで, エタノールで刺激をした PC12 細胞の細胞内ドーパミン量と有意な差は見られなくなった.

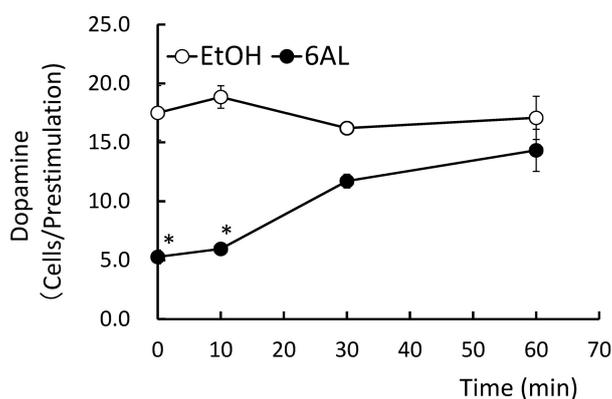


図 1 ヘキサナール刺激によりドーパミンを放出した PC12 細胞内のドーパミンの再蓄積

4 mM ヘキサナール (6AL) で刺激した PC12 細胞を, チロシンを含む KRH (KRH+Tyr) 中に 0 ~ 60 分置き, 細胞内のドーパミン量を測定した (●). PC12 細胞内のドーパミン量は, ヘキサナール刺激前に KRH+Tyr 中に PC12 細胞を 10 分間置いたときの細胞外液中のドーパミン量 (Prestimulation) に対する比 (Cells/Prestimulation) として求めた. 同様に, 対照として, ヘキサナールの溶媒として用いたエタノール (EtOH) で刺激した PC12 細胞内のドーパミン量を求めた (○). 測定試料数は各点で 3 試料ずつ測定した. 各点は, 3 つの試料の値の平均  $\pm$  標準誤差 (SE) とした.  $P$  値が 0.05 以下のものを有意差有として \* で示した.

## 2. ドーパミン再蓄積に対するチロシン及びモノアミン再取込み阻害薬の影響

ヘキサナール刺激後の細胞をチロシンを含むKRH中に1時間置くことにより細胞内にドーパミンが再蓄積した。モノアミンの1つであるドーパミンはチロシンを前駆体として、チロシン水酸化酵素及び芳香族アミノ酸脱炭酸酵素によって合成される。また、細胞外に放出されたドーパミンは細胞に再取込みされ利用される。ここでは、チロシンを用いてヘキサナール刺激後のドーパミンの再蓄積に対するドーパミンの合成作用、及び、モノアミン輸送体の阻害薬であるノミフェンシンとイミプラミンを用いてドーパミン再取込み作用を検討した(図2)。チロシン有無、あるいは、ノミフェンシン及びイミプラミン有無の条件下で、ヘキサナールで刺激をすると、すべての条件で、ドーパミンの放出が促進した。ヘキサナールによって放出されるドーパミン量に、チロシン有無、ノミフェンシン及びイミプラミン有無の違いによる有意な差は検出されなかった(図2A)。ヘキサナール及び対照であるエタノールの刺激を受けたPC12細胞を、再度、チロシン、あるいは、イミプラミン及びノミフェンシン有無のKRH中に1時間置き、細胞内ドーパミン量を測定した(図2B)。エタノール刺激後、チロシン非存在下に置いたPC12細胞は、細胞内に刺激前試料中に含まれるドーパミン量の約61倍量、ヘキサナール刺激をしたものは約32倍量のドーパミンを含んでいた。チロシン存在下に置いた場合、エタノール刺激をした細胞内ドーパミン量は、刺激前試料中のドーパミン量の約44倍、ヘキサナール刺激をしたものは、約36倍であった。ヘキサナール刺激後、チロシン非存在下に置いた細胞よりも、チロシン存在下に置いた細胞の方が細胞内ドーパミン量に高い増加傾向がみられたが、有意な差は検出されなかった。ノミフェンシン及びイミプラミンが存在する条件下では、存在しない条件に比べ、エタノール刺激、ヘキサナール刺激、チロシン有無のすべての条件下で、細胞内のドーパミン量は有意に低値を示した。

エタノール及びヘキサナール刺激をしたPC12細胞を1時間置いた細胞外液試料(Interval)に存在するドーパミン量は、どの条件でも同等であり、有意な差はみられなかった(図2C)。

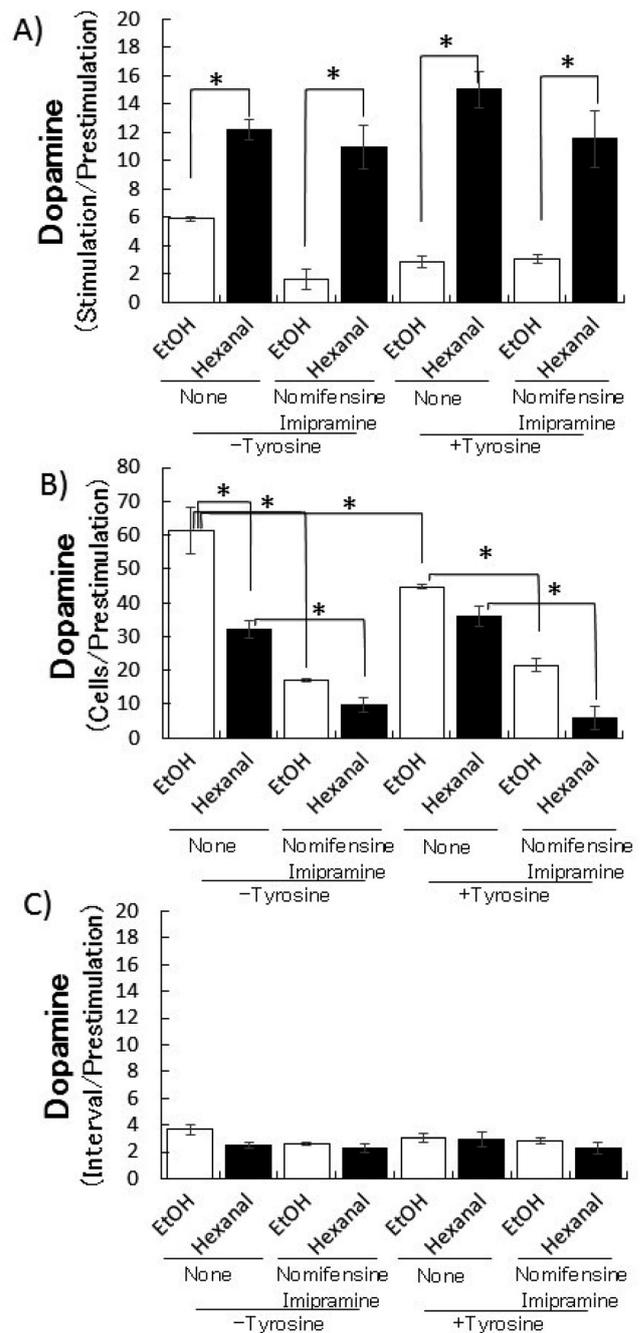


図2 ドーパミンを放出したPC12細胞内へのドーパミン再蓄積に対するチロシン、ノミフェンシン及びイミプラミンの効果

ドーパミンの前駆体であるチロシン(±Tyrosine)、及び、モノアミン再取込み阻害薬であるノミフェンシン及びイミプラミン有無(Nomifensine, Imipramine, None)の条件下でPC12細胞をヘキサナールで10分間刺激し、ドーパミンの放出を測定した(A)。ヘキサナールあるいはエタノールで刺激をした細胞をチロシン、ノミフェンシン及びイミプラミン有無のKRH中に1時間置いた後、PC12細胞(B)及び細胞外液(C)を回収し、それぞれのドーパミン量を測定した。それぞれのドーパミン量は、刺激前試料(Prestimulation)に含まれるドーパミン量に対する刺激後試料(Stimulation)、細胞試料(Cells)及び細胞外液試料(Interval)のドーパミン量の比として求めた。黒棒は、種々の条件下でヘキサナール(Hexnal)刺激をしたときのドーパミン量、白棒は対照であるエタノール(EtOH)で刺激をしたときのドーパミン量を示す。各群試料は3点ずつ測定し、平均±SEとして示した。群間でP値が0.05以下のものを有意差有として\*で示した。

## 3. PC12細胞へのドーパミン再蓄積に対するノミフェンシン及びイミプラミンの効果

ノミフェンシンは、ドーパミンの再取込み阻害薬として、イミプラミンは、セロトニンやノルアドレナリ

ンの再取込み阻害薬として用いられてる。ヘキサナール刺激後の PC12 細胞内へのドーパミン再蓄積は、ノミフェンシンとイミプラミンの両者を含む溶液中で抑制された。ドーパミン再取込みに対するそれぞれの寄与を明らかにするために、ノミフェンシン及びイミプラミンを、それぞれ単独及び混合し作用を検討した。PC12 細胞は、イミプラミン及びノミフェンシンが単独あるいは両方が存在する 50  $\mu$ M チロシンを含む KRH (KRH+Tyr) 中で前処理し、ヘキサナールあるいはエタノールで刺激をした。この細胞を前処理と同じ緩衝液中に 1 時間置き、細胞内のドーパミン量を測定した。エタノールで刺激をした PC12 細胞内ドーパミン量を 100 % として、それぞれの条件下に置いた細胞内ドーパミン量の割合を算出し比較した。ヘキサナールで刺激をされた細胞も、KRH+Tyr 中に 1 時間置くことで約 86 % のドーパミン量を示した。エタノールあるいはヘキサナール刺激後、ノミフェンシン存在下に置いた細胞内ドーパミン量はノミフェンシンを含まない KRH+Tyr 中に置いたものと有意な差は示さなかった。しかし、イミプラミン単独、及び、ノミフェンシンとイミプラミンの両者が存在する条件下では、細胞内ドーパミン量は、エタノールで刺激した場合には約 40 %、ヘキサナールで刺激をした場合には、約 25 % に留まった。ヘキサナールあるいはエタノール刺激にかかわらず、イミプラミン有無の違いによってドーパミン再蓄積量に有意な減少がみられた。

ノミフェンシン及びイミプラミンが存在しても、ヘキサナール刺激によって放出されるドーパミン放出量に有意な差はみられなかった(データは示していない)。

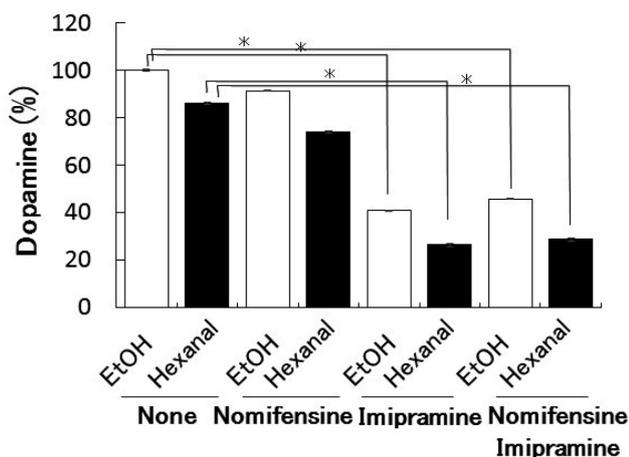


図3 ドーパミン再蓄積に対するノミフェンシン及びイミプラミンの効果

ヘキサナール(Hexanal, ■)あるいはエタノール(EtOH, □)で刺激をした PC12 細胞を、ノミフェンシン(Nomifensine)あるいはイミプラミン(Imipramine)単独、あるいは、ノミフェンシンとイミプラミンの両方を含む(Nomifensine, Imipramine)チロシンを添加した KRH 中に 1 時間置き、細胞内のドーパミン量を測定した。ドーパミン含有率(Dopamine (%))はエタノールで刺激後、ノミフェンシンもイミプラミンも含まない条件下 (None) に 1 時間おいた PC12 細胞内のドーパミン量を 100 % として、それに対する百分率として求めた。各群試料は 3 点ずつ測定し、平均±SE として示した。また、群間で P 値が 0.05 以下のものを有意差有として \* で示した。

## 考 察

PC12 細胞は、ヘキサナール刺激によってドーパミン放出を促進する。細胞が次の信号に対してドーパミンを放出するためには、ドーパミンを再度細胞内に蓄積する必要があり、PC12 細胞へのドーパミンの再蓄積について検討した。ヘキサナール刺激によって多くのドーパミンを放出した PC12 細胞は、1 時間で対照であるエタノールで刺激をされた細胞と同程度のドーパミン量まで回復した。ヘキサナール刺激により多くのドーパミンの放出が見られることから、ヘキサナールによる細胞損傷に起因するドーパミンの放出が懸念される。しかし、ヘキサナールを除くことにより、細胞内ドーパミン量の回復がみられ、細胞損傷ではないことも裏付けられる。

ヘキサナール刺激後の PC12 細胞にドーパミンの再蓄積が確認された。再蓄積の生じる要因として 1) チロシンを基質とするドーパミンの再合成、あるいは、2) 放出したドーパミンの輸送体を介した細胞内への再取込みが考えられる。チロシン存在下あるいはモノアミン再取込み阻害薬であるノミフェンシン及びイミプラミン存在下にヘキサナールで刺激をした細胞を置き、細胞内ドーパミン量を測定した。チロシン存在、非存在下では細胞内ドーパミン量の増加に有意な差は検出されなかった。しかし、チロシン存在、非存在にかかわらず、ノミフェンシン及びイミプラミンが存在する場合、細胞内ドーパミン量は有意に減少した。すなわち、ヘキサナール刺激後の PC12 細胞のドーパミン再蓄積には、モノアミン輸送体によるドーパミンの再取込みが大きく寄与することが示唆された。イミプラミンは神経細胞においてはセロトニン及びノルアドレナリンの再取込み阻害薬であり、ノミフェンシンはドーパミン再取込み阻害薬とされている。イミプラミン、ノミフェンシンをそれぞれ別に細胞外液に添加し、細胞内ドーパミン量を測定すると、神経細胞に対する作用とは逆に、イミプラミンによって細胞内のドーパミン量の再蓄積が抑制された。これは、PC12 細胞には、ドーパミン輸送体でなく、ノルアドレナリン輸送体が発現し、ドーパミン再取込みに関与しているという報告<sup>6)</sup>と一致する。また、ノミフェンシン及びイミプラミンの両方を添加した条件下でも、イミプラミンのみの条件と同様の細胞内ドーパミン蓄積の抑制があり、ノミフェンシンは、ヘキサナール刺激をした PC12 細胞のドーパミン再取込みには影響を与えないと言える。

以上の結果から、ヘキサナール刺激をした PC12 細

胞内へのドーパミン再蓄積には、ドーパミンのチロシンからの合成よりも、再取込みの影響を受けることがわかる。

しかし、今回の実験では、ヘキサナール刺激をした細胞の細胞外液は、刺激後の試料として回収し、再蓄積のために1時間細胞を置いた細胞外液 (Interval) 中には、ヘキサナール刺激によって放出されたドーパミンは含まれていない。また、図 2C に示すように、刺激後1時間 PC12 細胞を置いた細胞外液中のドーパミン量は、チロシン、イミプラミン及びノミフェンシン存在下で、有意な差は見られない。細胞外に放出したドーパミンを積極的に細胞が取込むのであれば、細胞外にドーパミンのない条件では、ドーパミンの再蓄積は生じないはずである。細胞外液のドーパミンがない状態でもドーパミン再蓄積が生じるのはなぜだろうか。ヘキサナール刺激をした細胞を1時間置いた細胞外液 (Interval) にもわずかながらドーパミンは検出されている。すなわち、この1時間の間も、PC12細胞は、細胞内に存在するドーパミン前駆体からドーパミンを合成し、自発的に細胞外に放出し続けている。ドーパミンは、チロシンから L-DOPA を介して合成される。ドーパミン合成において、チロシンを L-DOPA に代謝するチロシン水酸化酵素は律速酵素であり、ドーパミン合成量を制御している。L-DOPA を細胞外溶液に加えるとドーパミン合成量は増加する (データは示していない)。ヘキサナール刺激をした細胞内でも、細胞内のアミノ酸は不足した状態ではないため、チロシンの添加をしても L-DOPA の合成を促進せず、その結果、ドーパミンの合成量には大きな影響を与えなかったのかもしれない。また、ヘキサナールあるいはエタノールのどちらで刺激をした細胞でも、イミプラミン、ノミフェンシン存在下では細胞内ドーパミン再蓄積量は減少している。ヘキサナールあるいはエタノール刺激後に新たに合成されたドーパミンは、自発的に放出され、このドーパミンを細胞内に取込み、再蓄積をしているのではないかと考えている。また、刺激後、一時間置いた細胞外液中の 3-MT や HVA の量にも、ヘキサナール刺激有無では有意な差は検出されない (データは示していない)。そのため、自発的に放出されるドーパミンの多くは、代謝されずに高効率に取込まれ、再利用されているのではないかと考えている。

以上のことから、生体における作用を次のように考えた。食品に含まれるヘキサナールは、食品と共に摂取される。体内に移行したヘキサナールは、脳に到達し、ドーパミン放出を促進する。体内のヘキサナール

は、排泄器官や皮膚から放出され、血液中のヘキサナール濃度が減少する。ヘキサナールによるドーパミン放出をしなくなった細胞は、その後も、自発的なドーパミン放出をし、このドーパミンを輸送体を使って細胞内に取り込むことによって、定常のドーパミン量に戻るのではないだろうか。

現在、体内に入った匂い (香り) 物質の作用を検討するため、匂い (香り) 物質の体内移行の解析を *in vitro* 実験系を用いて進めている。

## 謝 辞

本研究は、日本学術振興会科学研究費挑戦的萌芽研究 (研究番号 JP15K12348) の助成を受け行っております。助成に対し、深く感謝いたします。

## 引用文献

- 1) Kako H., Kobayashi Y. et al.: Dopamine release from rat pheochromocytoma (PC12) cells and rat brain striata induced by a series of straight carbon chain aldehydes with variations in carbon chain length and functional groups. *Eur J Pharmacol*, 691(1-3): 86-92, 2012.
- 2) Kako H., Fukumoto S. et al: Effects of direct exposure of green odour components on dopamine release from rat brain striatal slices and PC12 cells. *Brain Res Bull*, 75(5): 706-12, 2008.
- 3) Kobayashi Y., Kako H. et al.: Contribution of intracellular  $Ca^{2+}$  concentration and protein dephosphorylation to the induction of dopamine release from PC12 cells by the green odor compound hexanal. *Cell Mol Neurobiol*, 30(2): 173-84, 2010.
- 4) Fornai F., Lenzi P. et al.: Fine ultrastructure and biochemistry of PC12 cells: a comparative approach to understand neurotoxicity. *Brain Res*, 1129(1): 174-90, 2007.
- 5) Kobayashi, Y.: Measurement of the concentrations of dopamine and its metabolites in PC12 cells and in extracellular fluid by detection of native fluorescence. *Bulletin of Kiryu University*, 24: 111-116, 2013.
- 6) Kantor L., Hewlett G.H. et al.: Protein kinase C and intracellular calcium are required for amphetamine-mediated dopamine release via the norepinephrine transporter in undifferentiated PC12 cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 297(3): 1016-24, 2001.

# Reaccumulation of dopamine into a rat pheochromocytoma cell line, PC12, after stimulation with *n*-hexanal

Yoko Kobayashi

## Abstract

All foods comprise odor compounds, which enter the body together with nutrients. Odor compounds that enter the body may cause physiological effects.

*n*-Hexanal (hexanal) is a straight-chain, six-carbon aldehyde that imparts a fresh plant flavor. Previously, we reported that hexanal directly stimulates dopamine release from rat striatal slices or rat pheochromocytoma (PC12) cells. These cells reaccumulate dopamine and then release it again in response to the next signal. In the current investigation, I studied dopamine reaccumulation into PC12 cells that released dopamine after stimulation by hexanal. PC12 cells were first stimulated with hexanal to release dopamine. The extracellular fluid was then harvested, the dopamine concentration in the fluid was measured, and added to new Krebs-Ringers HEPES buffer (KRH) and incubated. Dopamine was reaccumulated within 1 h by the PC12 cells immersed in the KRH. Reaccumulation of dopamine was prevented by imipramine, a monoamine reuptake inhibitor in the extracellular fluid. Tyrosine, a precursor of dopamine, did not have a significant effect on dopamine reaccumulation. Results of this study suggest that dopamine reuptake by monoamine transporters, rather than new dopamine synthesis, is responsible for dopamine reaccumulation into PC12 cells that had released dopamine in response to hexanal.

Based on this research, I conclude that dopamine was released when the concentration of odor compounds in the blood reached a sufficient level and that dopamine reaccumulation into cells was triggered when the concentration of odor compounds in the blood decreased.

*Keywords:* Dopamine, PC12 cells, *n*-Hexanal, Imiplamine